1D1630

A 型インフルエンザウイルス M2 イオンチャネルのチャネル活性化機構

○岡田 敦司、三浦 隆史、竹内 英夫（東北大院・薬）

A 型インフルエンザウイルスの M2 タンパク質 (M2) は、弱酸性条件下で活性が上昇するプロトン選択性の高いカチオンチャネルを形成する。本研究では、膜貫通領域に対応する 25 アミノ酸残基からなるペプチドをリポソームに再構成させ、紫外共鳴ラマン分光法により解析することにより、膜貫通領域に存在するヒスチジン (His) 側鎖およびトリプトファン (Trp) 側鎖の構造・環境の pH 依存性について調べ、チャネル活性化におけるこれらの残基の役割について検討した。

重水溶液の 244 nm 励起ラマンスペクトルにおいて、弱酸性条件下では、1407 cm^{-1} にヒスチニウムに由来すると考えられるバンドが観測された。このバンドの強度を pH に対してプロットした結果、His 側鎖の pK_a は 5.74 と求まった。この値は M2 を発現させた卵母細胞の膜貫通電流の pH 依存性から求められている pK 値 5.77 と近く、His 側鎖のプロトン化がチャネル活性化と密接に関連していると考えられる。一方、229 nm 励起ラマンスペクトルを測定した結果、pH 低下に伴う Trp バンドの強度増大が見られ、この変化の中間での pH は 5.52 であった。この値も上述の値と近く、Trp 側鎖環境もチャネル活性化と同時に変化していることがわかった。また、この時の Trp バンドの強度変化についてモデル実験で検討した結果、弱酸性条件下では Trp 側鎖の π 電子がカチオンと相互作用していると推察された。M2 イオンチャネルにおいて Trp 側鎖の近くには His 側鎖が存在することから、Trp 側鎖はプロトン化して正に荷電した His 側鎖との間でカチオン- π 電子相互作用を形成し、チャネルを開口させる働きを有すると考えられる。

A. Okada, T. Miura and H. Takeuchi : Activation mechanism of the M2 ion channel of influenza A virus

1D1700

低分子量 G タンパク質 Ras の蛍光標識と 1 分子イメージング

○松浦 秀幸¹、新井 由之¹、横田 浩章²、岩根 敦子³、石井 由晴²、片岡 徹⁴、柳田 敏雄^{2,3}（¹ 阪大・基、² 科学技術振興事業団・1 分子過程プロジェクト、³ 阪大・医、⁴ 神大・医）

Ras は、低分子量 G タンパク質であり、細胞の増殖と分化のシグナル伝達因子として重要な働きを担っている。Ras は通常、細胞内で GDP 結合体（不活性型）として存在しているが、ホルモンなどによる細胞外からの刺激により、活性型の GTP 結合体になり、そのシグナルを細胞膜上から核へ伝達する。Ras は複数の標的タンパク質と相互作用することで多様なシグナル伝達経路に関わっており、その分子メカニズムが興味を持たれている。最近、Ras のゆっくりとしたコンフォメーション変化による動的多形構造が、多様な機能をもたらすということが示唆された (1)。そこで、本研究では、1 分子蛍光イメージング技術を利用して、蛍光標識した Ras タンパク質 1 分子のコンフォメーション変化を実時間で観察することを目指している。

まず、C 末側 23 残基を欠損させ、ヒスチジン残基のタグを付加した H-Ras(1-166)-His を大腸菌で発現・精製し、蛍光色素でチオール基を特異的に修飾した。蛍光標識した Ras が Raf との結合活性を保持していることは、c-Raf-1 の Ras 結合ドメイン (48-206) の組換え体との *in vitro* binding assay により確認した。また、蛍光標識した Ras を His タグと Ni(II) の特異的結合によりガラス基板上に固定し、1 分子の蛍光像を得ることができた。さらに、1 分子の偏光やスペクトル変化の測定を行うことで、タンパク質の動的構造と機能の関係を調べる道が拓けると考えられる。

(1) Y. Ito et al. Biochemistry 1997; 36:9109-19.

H.Matsuura, Y. Arai, H. Yokota, A. Iwane, Y. Ishii, T. Kataoka, T. Yanagida : Single molecule imaging of small G protein Ras

1D1645

α -ラクトアルブミンのペプチド断片と脂質膜の相互作用

○亀田 充恵¹、美宅 成樹¹、清水 昭夫²、須貝 新太郎²（¹ 農工大・院工・生命工、² 創価大・工・生物工）

α -ラクトアルブミン (α -LA) はは乳類の乳腺で合成され、分子内に 1 個のカルシウムを結合した 123 残基の球状タンパク質である。 α -LA は酸性条件下あるいはカルシウムを除くことにより、三次構造は壊れているが天然様の二次構造は保持しているモルテングロビュール (MG) 状態を形成することが知られている。 α -LA は水溶性タンパク質であるから天然構造では単分散コロイドとして安定に存在しており、水中では会合性コロイドとして安定に存在する脂質膜とは通常相互作用しない。しかし、酸性条件下の MG 状態にある α -LA は中性燐脂質膜と強く相互作用し、リポソームサイズを変化させることが以前より知られている。この両者が相互作用する要因としては α -LA の構造が変化していることが考えられるが、中性条件下の apo- α -LA はリポソームサイズの変化を引き起こさないことや、蛍光・CD 測定の結果、脂質膜と混合する前後で apo- α -LA の構造に変化が見られないことが既に報告されている。これらの結果から、酸性条件下の MG 状態にある α -LA に脂質膜と相互作用する原動力があるのではないかと考え、ペプチド断片を用いてこれらを明らかにすることが本研究の目的である。具体的には、ジミリスチルフォスファチジルコリン (DMPC) リポソームと、膜挿入部位とされる α -LA の L81-K108 を含む 30 残基のペプチドを用いて以下の実験を行っている。(1) DMPC リポソームと混合する前後でのペプチドの構造変化 (CD 測定) (2) DMPC リポソームにペプチドは結合しているか (遠心・蛍光測定) (3) DMPC リポソームのサイズ変化 (濁り度測定)

M.Kameda, S. Mitaku, A. Shimizu, S. Sugai : Interaction between polypeptide fragments from α -lactalbumin and lipid bilayer membrane .

1D1715

B. stearothermophilus 由来リジル tRNA 合成酵素の L-リジン結合部位に存在する芳香族アミノ酸残基の関与

○滝田 禎亮¹、外村 辨一郎²、井上 國世¹（¹ 京大院農・応生科、² 近畿大・生物理工）

(目的) B. stearothermophilus 由来リジル tRNA 合成酵素 (B.s. LysRS) の L-リジン (Lys) 活性化反応は、まず Lys が結合し、次いで ATP が結合する、定序順列型であり、その第 1 段階において、Trp 由来蛋白質蛍光が減少し、第 2 段階において蛍光が回復する (1)。これらの蛍光変化は、Trp314 のみに帰因するが、すべての Trp を置換した変異体 B.s. LysRS、W314F/W332F においても Lys 結合に際して Tyr 由来の蛋白質蛍光が増加する (2)。今回は、この Tyr の同定とその役割の解明を試みた。(方法) B.s. LysRS の推定 Lys 結合部位にある Tyr271 と Phe450 に注目した。野生型及び 4 種の変異体: W314F/W332F、W314F/W332F/Y271F、Y271F、F450Y の、Lys 依存的 ATP-PPi 交換反応、Lys の蛍光滴定および UV 吸収差スペクトルを測定した。(結果と考察) 酵素活性においては、Y271F は、野生型に比べ、 $K_m(\text{ATP})$ 、 $K_m(\text{PPi})$ 、 k_{cat} 値は変化しなかったが、 $K_m(\text{Lys})$ が 500 倍以上上昇した。F450Y は、野生型と類似した値を示した。これらから、Tyr271 の水酸基は、反応の第 1 段階にのみ寄与し、他の段階には関与せず、Phe450 に付加した水酸基は本反応には寄与しないと推定した。一方、W314F/ W332F で観察された Lys 結合による Tyr 残基の蛍光増加と UV 吸収差スペクトル変化が、Y271F/W314F/W332F では消失し、これらが Tyr271 に起因することが明らかになった。さらに、蛍光滴定の $K_d(\text{Lys})$ と ATP-PPi 交換反応の $K_m(\text{Lys})$ の一致は、Lys の結合と Trp314 および Tyr271 の蛍光変化をもたらす環境変化が連動していることを支持した。Lys 結合による蛍光変化の pH 依存性は、Trp314 は $\text{pKa}10$ 付近をもつ残基の影響を受けることを示唆するが、その残基は Tyr271 ではないと考えられる。Takita et al., (1) J.B. 119, 680-689 (1996), (2) 投稿準備中

T.Takita, B. Tonomura, K. Inouye : Role of aromatic residues in the L-lysine binding site of lysyl-tRNA synthetase from B. stearothermophilus